操作手順

CONTENTS

I. サンプルからの遺伝子抽出
II. 試薬の調製
III. 試薬分注およびサンプル溶液の添加
IV. LAMP反応および検出
V. 結果判定
VI. 検査フローチャート

I. サンプルからの遺伝子抽出

❑ サンプルからの遺伝子抽出 (図 9)

QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いた抽出の手順
【操作は領域Bで行います。】

① 1.5mLまたは2.0mL滅菌マイクロチューブに予めBuffer AVL/Carrier RNAを 560μL分注し、そこに試験材料液140μLを添加します。
❖ Buffer AVL/Carrier RNA は析出していますので、予め湯煎等で析出物を溶解してご使用ください。
② キャップを閉め、15秒間ボルテックスします。
③ 室温にて10分間インキュベートし、その後スピンダウンをします。
❖ この段階で検体は非感染化されます。
④ エタノール (96～100%) を560μL添加します。
⑤ キャップを閉め、15秒間ボルテックスし及びスピンダウンをします。
⑥ ⑤の混合液のうち630μLを予め2.0mLコレクションチューブ (キット同梱:以下「コレクションチューブ」) にセットしたスピンカラムに注入します。
⑦ キャップを閉め、6,000×*g*, 1分間遠心分離します。
⑧ スピンカラムを新しいコレクションチューブにセットし、ろ液の入ったチューブは捨てます。
⑨ 残りの⑤混合液630μLを⑥～⑧の操作に供します。
⑩ スピンカラムにBuffer AW1 500μLを添加します。
⑪ キャップを閉め、6,000×*g*, 1分間遠心分離します。
⑫ スピンカラムを新しいコレクションチューブにセットし、ろ液の入ったチューブは捨てます。
⑬ スピンカラムにBuffer AW2を 500μL添加します。
⑭ キャップを閉め、20,000×*g*, 3分間遠心分離します。
⑮ スピンカラムを新しいコレクションチューブにセットし、ろ液の入ったチューブは捨てます。
⑯ (オプション) キャップを閉め、20,000×*g* 、1分間遠心分離します。
⑰ (オプション) スピンカラムを新しい1.5mLマイクロチューブにセットし、ろ液の入ったチューブは捨てます。
⑱ スピンカラムにBuffer AVEを 60μL添加します。
⑲ 室温にて10分間インキュベートし、その後1分間6,000×*g* 、1分間遠心分離します。
⑳ ろ液をRNA抽出液とします。

❖ ⑯、⑰のオプション操作は必須ではありません。
❖ サンプル溶液は原則として直ちに測定してください。
❖ RNA抽出液はは-20℃あるいは-70℃で保存する場合1年まで安定です。



図 9．抽出の流れ

II. 試薬の調製　III. 試薬分注およびサンプル溶液の添加

❏ 試薬の調製

- ❖ 操作は氷上で行ってください。
- ❖ マスターミックスは検査毎に調製し、作り置きはしないでください。調製後は氷上で保存し、速やかに使用してください。
- ❖ 必要量を採取した残りの試薬は速やかに所定の温度に保存してください。

【操作は領域Aで行います。】

① -20℃で保存していた酵素以外のキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存します。Enzyme Mix.(EM)は、そのまま氷上で保存します。

② 融解した2×Reaction Mix. NV(RM NV)、Primer Mix. NVG1またはG2(PM NVG1またはG2)、Distilled Water(DW)をタッピングにて混合しスピンダウンを行います。Enzyme Mix.(EM)は、スピンダウンのみ行います。

❖ Enzyme Mix.(EM)は、必要量を採取した残りの試薬は速やかに凍結保存してください。

③ 別途用意した1.5mL滅菌チューブに、各試薬を分注します。

- ▩ 各試薬1テストあたり2×Reaction Mix. NV(RM NV)12.5μL、Primer Mix. NVG1またはG2(PM NVG1またはG2)2.5μL、Distilled Water(DW) 4.0μLを、陽性･陰性コントロールを含めた必要なテスト数分、分注します。
- ❖ 実際のサンプル数＋α分のマスターミックスを調製することにより、滞りなく分注することができます(例:20サンプル実施の場合、21サンプル分のマスターミックスを調製)。

④ ボルテックスミキサー(1秒間×3回)で十分混合した後、スピンダウンします。

⑤ 95℃、5分間インキュベートし、直ちに5分間氷冷します。

⑥ チューブをいったんスピンダウンし、Enzyme Mix.(EM)を1テストあたり1.0μL加えます。

⑦ 転倒混和あるいはボルテックスミキサー(1秒間×3回)により十分混合した後、スピンダウンし、マスターミックスとします。なお調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

❏ 試薬分注およびサンプル溶液の添加(図10)

- ❖ 操作は氷上で行ってください。
- ❖ マスターミックスを分注する前に、反応チューブにヒビ･キズ等がないことを目視で確認してください。

【操作は領域Aで行います。】

① キット添付のPositive Controlと、陰性コントロールとしてDistilled Water(DW)を予め準備しておきます。

- ❖ <u>陰性コントロールとして使用するDWは、試薬開封の際に100μL程度マイクロチューブに分取し、陰性コントロール専用として領域Cにて使用、保存します。</u>

② 試薬調製用のクリーンベンチ内でLoopamp反応チューブにそれぞれマスターミックスを20μLずつ分注し、すべてのキャップを閉じます。

【操作は領域Cで行います。】

③ マスターミックス20μLが分注されている反応チューブにサンプルを5μLずつ添加し、ピペッティングで十分に混合します。

- ▩ PC NVは大量のRNAを含むため、取り扱いには十分注意してください(使用前にはスピンダウンを行ってください。反応チューブへの添加は最後に行ってください)。
- ▩ サンプルの添加は、コンタミネーションを避けるため、陰性コントロール(DW)、サンプル溶液、陽性コントロール(PC NVG1またはG2)の順で行うことをお勧めします。
- ▩ ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくり行ってください。
- ▩ コンタミネーションを避けるため、サンプル添加後はしっかりとキャップを閉めてから、次のサンプルを添加してください。

④ キャップを閉め、スピンダウンします。

⑤ スピンダウン終了後にはチューブ内に気泡がないことを確認してください。

- ▩ 反応液中に気泡ができた場合は、スピンダウンで取り除いてください。マスターミックス調製は、氷上で操作を行ってください。

マスターミックスの調製分量

テスト数	1test	___tests
2×Reaction Mix. NV (RM NV)	12.5μL	12.5μL× ___ =_____μL
Primer Mix. NVG1 (PM NVG1)	2.5μL	2.5μL × ___ =_____μL
Distilled Water (DW)	4.0μL	4.0μL× ___ =_____μL
●インキュベート　95℃、5分間 ●氷冷　5分間		
Enzyme Mix (EM)	1.0μL	1.0μL× ___ =_____μL
2×Reaction Mix. NV (RM NV)	12.5μL	12.5μL× ___ =_____μL
Primer Mix. NVG2 (PM NVG2)	2.5μL	2.5μL × ___ =_____μL
Distilled Water (DW)	4.0μL	4.0μL× ___ =_____μL
●インキュベート　95℃、5分間 ●氷冷　5分間		
Enzyme Mix (EM)	1.0μL	1.0μL× ___ =_____μL





図 10. 試薬分注
およびサンプル溶液の添加

Ⅳ. LAMP反応および検出

❏ LAMP反応および検出【領域D】

◆ LAMP反応および検出はリアルタイム濁度測定装置にて行います。LAMP反応条件は63°C60分間、その後反応停止条件として80°C、5分間とします。

① 使用する20分前までに電源を入れ装置を立ち上げてください。
　◇ 検体の前処理を始める前に、パラメーターを選び、あらかじめ測定装置を加温状態にしてください。

② 反応チューブを測定機器にセットする際は、チューブにヒビ・キズ等がないこと、ブロックが測定温度になっていることを確認後、キャップの開け口を手前にセットし、チューブのキャップが全てしっかりと閉まっていることを確認してください。

③ 反応チューブを検出部に入れる際は、チューブ内に気泡がないことを確認してください（気泡があると、誤った判定の原因となります）。

④ 反応チューブを測定機器にセット後は、速やかに測定開始してください（LAMP法は等温で反応が進行するため、セットした時点から反応は始まっています）。

◆ LA-320C（図11）

① 本体がパソコンに接続されていることを確認し電源を投入してください。

② パソコンを起動し「LA-320C制御ソフト」を起動してください。

③ 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください）。

④ 予備加熱終了後、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。
　◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実に行ってください。

⑤ [測定開始]を確実にクリックし測定を開始します。
　◇ [測定開始]をクリックしないとデータが保存されず、判定ができなくなってしまいます。

⑥ 32チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。





図 11. LA-320C本体（上）とサンプル測定部（下）

◆ RT-160C（図12）

① 本体の電源を投入してください。

② 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください）。

③ 予備加熱終了後 、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。
　◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実に行ってください。

④ [Start/Heat]ボタンを押し、測定を開始します。

⑤ 16チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。





図 12. RT-160C本体（上）とサンプル測定部（下）

❖ 反応開始後は、測定機器のフタ（ホットボンネット）を開けないでください。

❖ 反応後のチューブを検出部から取り出す際はチューブを破損しないように慎重に取り扱ってください。また反応チューブのキャップは、決して開けないでください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因になるだけではなく、試験環境を汚染し、汚染を除去しない限り、以後の試験で正しい結果が得られなくなる可能性があります。

V. 結果判定

❑結果判定［領域D］

◆判定の前に（図13）

判定の際には以下の点を確認した上で実施してください。

- 陽性コントロール、陰性コントロールの反応が適切に進行している。
  - ◇ 正常な反応が行われている場合、陽性コントロール、陰性コントロールおよび検体の増幅曲線は図13のようなパターンを示します。
  - ◇ 陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していなければ、LAMP反応は正常に進行しています。
- 増幅モードの増幅曲線による濁度上昇の有無。

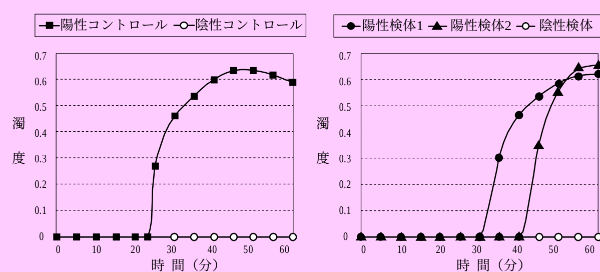


図 13. コントロールの増幅曲線パターン（左）
検体の増幅曲線パターン（右）

＊；本キットは定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではありません。
したがって、濁度の立ち上がり時間で、コピー数を推定することはできません。

◆LA-320C（図14）

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します（縦軸：Abs、横軸：時間）

② 判定モード

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③ 結果モード

- 測定結果を棒グラフで表示し、判定カードの色で判定結果の確認ができます。
- 陽性ー赤、陰性ー緑、測定中ー黄　（青ー増幅分）

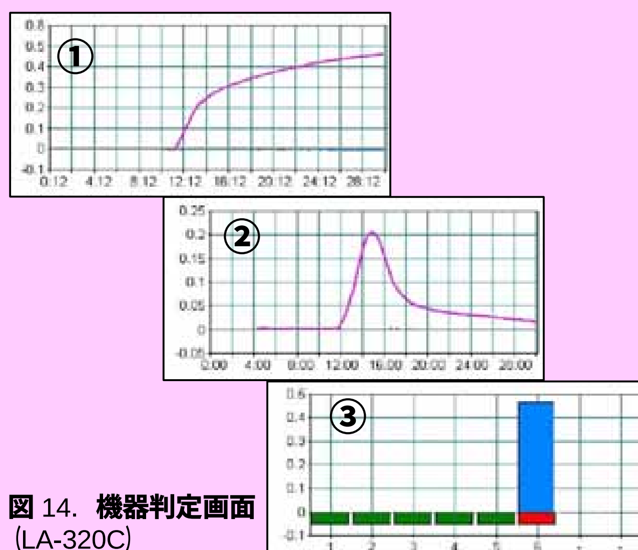


図 14. 機器判定画面（LA-320C）

◆RT-160C（図15）

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します(縦軸：Abs、横軸：時間)。

② 微分グラフ表示

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③ 数値表示

- 測定結果を吸光度、立上り時間、判定で表示します。

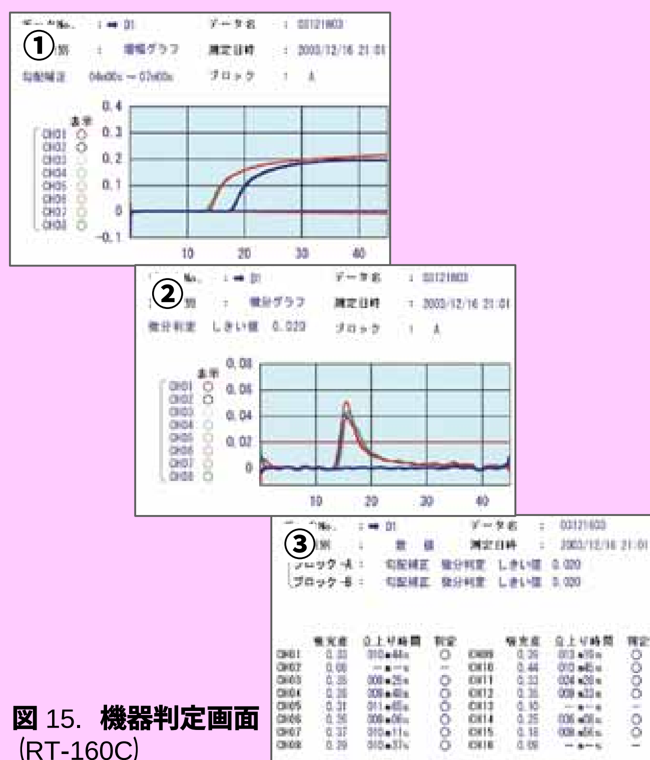
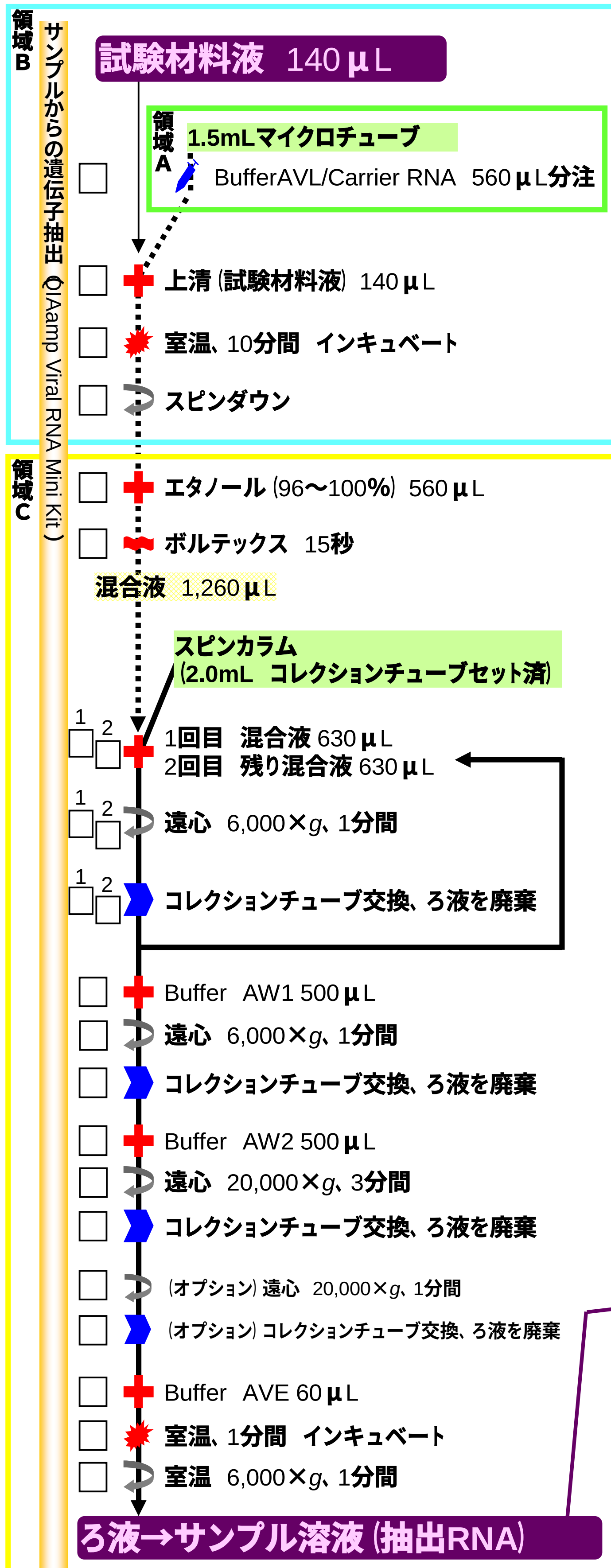


図 15. 機器判定画面（RT-160C）

◆注意事項

- 上記装置による判定は陽性／陰性を確定するものではありません。あくまでも判定を補助するための機能です。
- 最終的な結果判定は、陰性／陽性コントロールを比較対象とし増幅曲線で濁度の上昇を確認することによって行ってください。
- 詳細内容および上記以外の装置およびLAMP法試薬を用いての判定に関しては、各機器・試薬の取扱説明書・添付文書をご確認ください。

VI. 検査フローチャート



マスターミックス調製

	テスト数	1test	tests
ノロウイルスGI	2×Reaction Mix. NV (RM NV)	12.5μL	①______μL
	Primer Mix.NVG1 (PM NVG1)	2.5μL	②______μL
	Distilled Water (DW)	4.0μL	③______μL
	Enzyme Mix.(EM)	1.0μL	④______μL
ノロウイルスGII	2×Reaction Mix. NV (RM NV)	12.5μL	⑤______μL
	Primer Mix.NVG2 (PM NVG2)	2.5μL	⑥______μL
	Distilled Water (DW)	4.0μL	⑦______μL
	Enzyme Mix.(EM)	1.0μL	⑧______μL

